

COPIA OFICIAL
CONVENIO DE PARIS
-Lisboa 1958-

09/830964

4
/99/26241

REPUBLICA



ARGENTINA

6599/26241
Ministerio de Economía
y Obras y Servicios Públicos
Instituto Nacional de la Propiedad Industrial

REC'D 25 JAN 2000

WIPO

PCT

CERTIFICADO DE DEPOSITO

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Acta N° P 99 01 00680

El Comisario de la Administración Nacional de Patentes, certifica que con
fecha 23 de FEBRERO de 19 99 se presentó a nombre de BIO SIDUS
S.A. CON DOMICILIO EN BUENOS AIRES - REPUBLICA ARGENTINA.

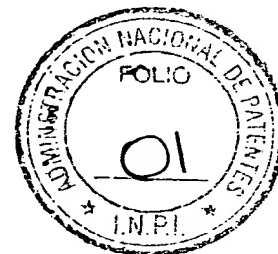
una solicitud de Patente de Invención relativa a "PROCEDIMIENTO PARA LA PURIFICACION
DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE A PARTIR DE SOBRENADANTE DE
CULTIVO DE CELULAS Y ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE OBTENIDA CON
TAL PROCEDIMIENTO"

cuya descripción y dibujos adjuntos son copia fiel de la documentación depositada en el
Instituto Nacional de la Propiedad Industrial.

Se certifica que lo anexado a continuación en TREINTA Y DOS fojas es copia fiel de los
registros de la Administración Nacional de Patentes de la República Argentina de los
documentos de la solicitud de Patentes de Invención precedentemente identificada.

A PEDIDO DEL SOLICITANTE Y DE CONFORMIDAD CON LO ESTABLECIDO EN
LA CONVENCION DE PARIS (LISBOA 1958), APROBADO POR LEY 17.011, EXPIDO LA
PRESENTE CONSTANCIA DE DEPOSITO EN BUENOS AIRES, REPUBLICA ARGENTINA, a
los VEINTISIETE días del mes de MAYO de 1999.

Ing. GERARDO P. BELLOTTI
COMISARIO
ADM. NACIONAL DE PATENTES



Memoria Descriptiva de la Patente de Invención

Sobre

Procedimiento para la purificación de Eritropoyetina Humana Recombinante a partir de sobrenadantes de cultivo de células y Eritropoyetina Humana Recombinante obtenida con tal procedimiento.

Solicitada por

Bio Sidus S.A.

Por el plazo de 20 años



Constitución 4234 - 1254
Buenos Aires - Argentina

PROCEDIMIENTO PARA LA PURIFICACION DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE A PARTIR DE SOBRENADANTES DE CULTIVO DE CÉLULAS Y ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE OBTENIDA CON TAL PROCEDIMIENTO



I. Descripción Técnica de la Invención

Un método para la obtención de eritropoyetina (EPO) caracterizado por una secuencia de pasos concatenados de separación que incluyen precipitación diferencial, cromatografía líquida de interacción hidrofóbica, cromatografía líquida de intercambio aniónico, cromatografía líquida de intercambio catiónico y cromatografía líquida de exclusión molecular. La EPO obtenida mediante el método descrito.

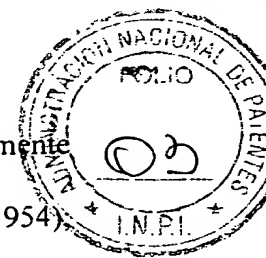
II. Campo Técnico de la Invención

La presente invención se refiere a un método para la purificación de EPO.

III. Estado de la Técnica

La EPO es una glicoproteína que estimula la diferenciación de eritroblastos en la médula ósea, incrementando así el número de eritrocitos en la sangre. La vida promedio de los eritrocitos en humanos es de 120 días, por lo cual un ser humano pierde 1/120 de sus eritrocitos cada día. Esta pérdida debe ser continuamente repuesta para mantener estable la cantidad de glóbulos rojos.

La existencia de la EPO fue postulada desde principio de siglo y fue definitivamente demostrada por Reissman y Erslev a principios de los 50'. Ver Carnot, et al., *C.R. Acad. Sci.*, (Francia), 143, 384-6 (1906); Carnot, et al., *C.R. Acad. Sci.*, (Francia), 143, 432-5 (1906); Carnot, et al., *C.R. Soc. Biol.*, 111, 344-6 (1906); Carnot, *C.R. Soc. Biol.*, 111, 463-5 (1906); Reissman, *Blood*, 1950, 5, 372-80 (1950) y Erslev, AR 98-01-05610

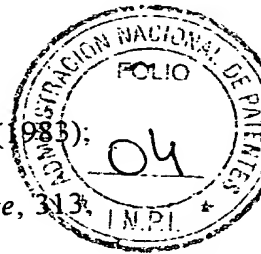


Blood, 8, 349-57 (1953). Los experimentos de Reissman y Erslev fueron rápidamente confirmados por otros investigadores. Ver Hodgson, et al., *Blood*, 9, 299-309 (1954); Gordon, et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 86, 255-8 (1954) y Borsook, et al., *Blood*, 9, 734-42 (1954).

La individualización del sitio de producción despertó un gran debate. Sucesivos trabajos llevaron a identificar al riñón como el principal órgano y a las células intersticiales peritubulares como el sitio de síntesis productor. Ver Jacobson, et al., *Nature*, 179, 633-4 (1957); Kuratowska, et al., *Blood*, 18, 527-34 (1961); Fisher, *Acta Hematol.*, 26, 224-32 (1961); Fisher, et al., *Nature*, 205, 611-2 (1965); Frenkel, et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 149, 1, 292-3 (1968); Busuttil, et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 137, 1, 327-30 (1971); Busuttil, *Acta Haematol.*, (Suiza), 47, 4, 238-42 (1972); Erslev, *Blood*, 44, 1, 77-85 (1974); Kazal, *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 5, 2, 98-109 (1975); Sherwood, et al., *Endocrinology*, 99, 2, 504-10 (1976); Fisher, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 28, 101-22 (1988); Jelkmann, et al., *Exp. Hematol.*, 11, 7, 581-8 (1983); Kurtz, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (EE.UU.), 80, 13, 4008-11 (1983); Caro, et al., *J. Lab. Clin. Med.*, 103, 6, 922-31 (1984); Caro, et al., *Exp. Hematol.*, 12, 357 (1984); Schuster, et al., *Blood*, 70, 1, 316-8 (1986); Bondurant, et al., *Mol. Cell. Biol.*, 6, 7, 2731-3 (1986); Bondurant, et al., *Mol. Cell. Biol.*, 6, 7, 2731-3 (1986); Schuster, et al., *Blood*, 71, 2, 524-7 (1988); Koury, et al., *Blood*, 71, 2, 524-7 (1988); Lacombe, et al., *J. Clin. Invest.*, 81, 2, 620-3 (1988); Koury, et al., *Blood*, 74, 2, 645-51 (1989).

Una proporción menor, de 10% a 15% del total de la EPO es producida por el hígado en adultos. Ver Naughton, et al., *J. Surg. Oncol.*, 12, 3, 227-42 (1979); Liu, et al., *J. Surg. Oncol.*, 15, 2, 121-32 (1980); Dornfest, et al., *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 11, 1, 37-46 (1981); Dinkelaar, et al., *Exp. Hematol.*, 9, 7, 796-803 (1981); Caro, et al., *Am. J.*

AR 98-01-05610

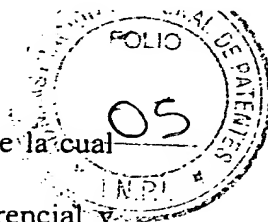


Physiol., 244, 5 (1983); Dornfest, et al., *J. Lab. Clin. Med.*, 102, 2, 274-85 (1983); Naughton, et al., *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 13, 5, 432-8 (1983); Jacobs, et al., *Nature*, 313, 6005, 806-10 (1985); Erslev, et al., *Med. Oncol. Tumor. Pharmacother.*, 3, 3-4, 159-64 (1986). La EPO se produce proporcionalmente al grado de hipoxia de los tejidos, y su expresión crece mediante el aumento del número de células productoras.

La EPO es una proteína que ha demostrado gran eficacia para el tratamiento de anemias causadas por diferentes factores, en especial la anemia de origen renal. Sin embargo, su disponibilidad terapéutica estuvo limitada hasta hace poco tiempo por la falta de un método de producción masivo, ya que la cantidad y calidad de la EPO obtenida por cualesquiera de los sistemas extractivos conocidos eran insuficientes. Recientemente, el uso de técnicas de ADN recombinante ha viabilizado la obtención de proteínas en grandes cantidades. La aplicación de estas técnicas a células eucarióticas ha permitido la producción a gran escala de EPO. Ver patentes EE.UU. 5.688.679 (Powell), 5.547.933 (Lin), 5.756.349 (Lin), 4.703.008 (Lin) y 4.677.195 (Hewick et al.)

Una vez asegurada la productividad, el siguiente problema son los sistemas de separación de la EPO, fundamentales para garantizar la pureza necesaria para su aplicación en seres humanos.

Actualmente existen diversas técnicas para la separación de glicoproteínas como la EPO. Entre estas técnicas se encuentran la ultrafiltración, el electroenfoque en columna, el electroenfoque en lecho plano, la filtración por medio de geles, la electroforesis, la isotacoforesis y varios otros métodos cromatográficos. Entre las técnicas de cromatografía más utilizadas se encuentran el método de intercambio iónico y la cromatografía de adsorción.

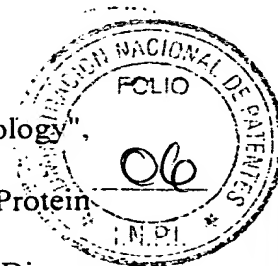


El método de intercambio iónico es una técnica de separación mediante la cual los componentes de la solución son distinguidos de acuerdo a su carga diferencial y aislados mediante elución, ya sea por etapas o a través de la aplicación de un gradiente continuo, con eluentes de diversa fuerza iónica o pH. El método utiliza una matriz de gel o resina, ya sea de carga positiva o negativa, para inducir el pegado o adsorción electrostática de los componentes de carga opuesta. Durante la desorción o elución los componentes de la muestra son desplazados de la resina por los iones presentes en la solución o *buffer* utilizado para eluir, o por una modificación de pH que altere la carga diferencial de la molécula de interés.

La cromatografía de adsorción en fase reversa involucra la separación de los componentes de la muestra según sus diferentes polaridades. Los componentes de la muestra son primeramente adsorbidos por una resina compuesta por una matriz de sílica recubierta por un polímero orgánico. Posteriormente, al verificarse el desplazamiento de los componentes por moléculas no polares del solvente de elución, ya sea por etapas o a través de la aplicación de un gradiente continuo, se obtiene la desorción selectiva de la muestra.

Las técnicas de separación arriba mencionadas fueron inicialmente utilizadas en la separación de moléculas hidrofóbicas o hidrofílicas relativamente pequeñas. Su aplicación a la separación de moléculas más grandes, como proteínas, y en especial a proteínas complejas como lipoproteínas, nucleoproteínas y glicoproteínas, es más reciente. Varias publicaciones ilustran el estado de la técnica en lo relativo a la separación de proteínas.

Ver Sofer, et al., "Handbook of Process Chromatography", (Academic Press Inc., San Diego, California, 1997); Olson, Ed., "Separation Technology", (Interpharm AR 98-01-05610



Press, Inc., Buffalo Grove, Illinois, 1995); Franks, Ed., "Protein Biotechnology", (Humana Press, Totowa, New Jersey, 1993); Deutscher, Ed., "Guide to Protein Purification", Methods of Enzymology, Vol. 182 (Academic Press Inc., San Diego, California, 1991); Seetharam y Sharma, Eds., "Purification and Analysis of Recombinant Proteins", (Marcel Dekker, Inc., New York, New York, 1991); Harris y Angal, Eds., "Protein Purification Applications", (Oxford University Press, Oxford, England, 1990); Brown, et al., *Analytical Biochemistry*, 99, 1-21 (1979); Harrison, et al., "VDYAC TM Comprehensive Guide to Reverse Phase Materials for HPLC", pp. 1-12, (The Sep/A/Ra/Tions Groups, Hesperia, California, 1984).

Por otro lado, los solventes no polares recomendados o utilizados usualmente para la separación de proteínas y polipéptidos mediante la técnica de cromatografía líquida de alta presión en fase reversa incluyen reactivos, tales como acetonitrilo, difíciles de remover de la proteína interesada y potencialmente tóxicos para los seres humanos. Ver Parsons, et al., *Endocrinology*, 114, 6, 2223-2227 (1984). Cabe señalar, no obstante, que se han utilizado soluciones acuosas de etanol y ácido fórmico para la elución de proteínas. Ver Takagaki, et al., *Journal of Biological Chemistry*, 5, 4, 1536-1541 (1980).

Anteriormente, factores hematopoyéticos de interés por su uso terapéutico en humanos como EPO, trombopoyetina y el factor estimulante de colonias de granulocitos eran obtenidos de fuentes urinarias. Ver Miyake, et al., *Journal of Biological Chemistry*, 252, 15, 5558-5564 (1979). La recuperación de estas proteínas de fuentes urinarias se caracterizaba por su bajo rendimiento, inadecuada pureza y alto costo debido al bajo nivel de concentración en que ocurren naturalmente estas proteínas.

También es conocida la aplicación de cromatografías de inmunoafinidad para la recuperación de proteínas mediante el uso de anticuerpos monoclonales específicos para la proteína de interés. Sin embargo, en el caso particular de la EPO, al inducirse el cambio de la constante de afinidad del anticuerpo monoclonal por la proteína para lograr su recuperación, se reduce drásticamente la actividad biológica de la EPO.

Recientemente se han revelado varios métodos específicos para la separación de EPO recombinante. Uno de estos métodos consiste en la recuperación de la proteína por cromatografía de intercambio aniónico con eliminación selectiva de proteasas, seguida de una cromatografía de fase reversa y filtración. Ver patente EE.UU. 4.667.016 (Lai, et al.) Esta técnica reclama un rendimiento del 16 % de EPO con actividad específica y pureza desconocidas.

Otro método propuesto para la separación de EPO recombinante consiste en la aplicación de cromatografía líquida de alta presión en fase reversa a una solución de la proteína parcialmente purificada. Ver patente EE.UU. 4.677.195 (Hewick, et al.) Este método no ha podido ser reproducido en la práctica.

IV. Descripción de la Invención

Aunque existe una gran cantidad de información referente a la producción de EPO recombinante humana, no se ha descrito un método de purificación que resulte en una EPO apta para su utilización en seres humanos, con una pureza mayor al 99 % y con ausencia de contaminantes como: a) material agregado, b) material degradado, c) proteínas espúreas y, d) proteasas. Una pureza menor del 99 % o la presencia de cualquiera de los contaminantes mencionados puede ser tóxico para el ser humano.



Por otro lado, varios de los métodos propuestos para la purificación de EPO no son aplicables eficientemente a escala industrial. Algunos de los métodos conocidos incorporan pasos de cromatografía líquida de alta presión en fase reversa. Este método requiere, por un lado, una mayor inversión en equipos y mantenimiento comparado con otros métodos de separación y, por otro lado, utiliza solventes orgánicos que encarecen el proceso de purificación y que son además, peligrosos, difíciles de manejar y altamente contaminantes al medio ambiente. Otros de los métodos propuestos son irreproducibles en la práctica o poseen baja recuperación de la proteína.

La presente invención describe un sistema de purificación de EPO caracterizado por una alta recuperación, pureza y calidad de la proteína obtenida.

Una ventaja del procedimiento descrito en esta patente es la obtención de EPO libre de proteasas y de variantes moleculares no deseadas como agregados, degradados y moléculas de punto isoeléctrico diferentes del esperado, entre otros. La EPO obtenida mediante el método reivindicado posee más del 99 % de pureza y puede ser utilizada para formular compuestos farmacéuticos para su uso en humanos sin necesidad de tratamientos de purificación posteriores. La EPO obtenida mediante el procedimiento reivindicado es una proteína heterogénea conformada por no menos de 5 y no más de 8 isoformas de punto isoeléctrico comprendido entre 3,0 y 4,5 y posee una actividad biológica específica *in vivo* de más de 100.000 UI/mg de proteína medido por la presencia de ⁵⁹Fe en ratones policitémicos ex-hipóxicos.

Otra de las ventajas de la invención reivindicada consiste en su reproducibilidad a escala industrial y su bajo impacto ambiental. El procedimiento reivindicado es un proceso limpio que no utiliza pasos de separación basados en cromatografía líquida de alta presión en fase reversa, ni utiliza solventes orgánicos que puedan ser dañinos al

AR 98-01-05610

medio ambiente.

Una ventaja adicional de la invención es que evita someter la EPO a condiciones extremas de temperatura o exponerla a solventes orgánicos u otras soluciones que pueden resultar agresivos para la proteína o tóxicos para su uso en seres humanos.

El método reivindicado consiste de varios pasos de separación que incluyen una precipitación diferencial de sobrenadantes de cultivos de células conteniendo EPO, concentración y diafiltración, y cromatografías por interacción hidrofóbica, por intercambio aniónico, por intercambio catiónico y por exclusión molecular. Los ejemplos siguientes ilustran los pasos de separación seguidos en el método reivindicado.

EJEMPLO 1. RECUPERACIÓN (CLARIFICACIÓN)

En 30 litros de concentrado estéril (Ver solicitud de patente AR-98-01-05611, del 6 de noviembre de 1998), proveniente de sobrenadantes de cultivo de células productoras de EPO, que contenían 10,7 g de EPO, se disuelven 7.920 gramos de sulfato de amonio. La solución se mantiene a 4 °C durante 24 h. Varias proteínas contaminantes precipitan mientras la EPO permanece en solución. El producto es centrifugado a 5.000 RPM, en una centrifuga marca Sorvall, utilizando un rotor HG4L. Este paso de separación rinde 10,7 gramos de EPO.

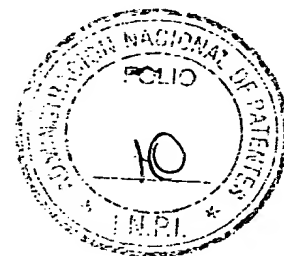
EJEMPLO 2. CROMATOGRAFÍA DE INTERACCIÓN HIDROFÓBICA

El material proveniente del paso anterior es cromatografiado utilizando una matriz de interacción hidrofóbica (Phenyl Sepharose 6 Fast Flow low sub.- Pharmacia) de acuerdo a los siguientes parámetros y condiciones:

1. Equipamiento

a. Pre-Columna





- 1) Diámetro: 10 cm
- 2) Altura de lecho: 25 cm
- 3) Matriz
 - a) Q-Sepharose Big Bead. (Pharmacia)
 - b) Volumen : 2.000 ml

b. Columna

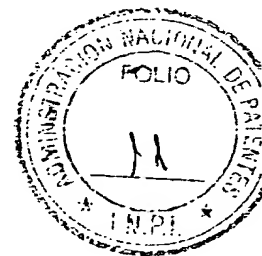
- 1) Diámetro: 20 cm
- 2) Altura de lecho: 13 cm
- 3) Matriz:
 - a) Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow low sub. (Pharmacia)
 - b) Volumen: 4.000 ml

2. Soluciones y Buffers

- a. Buffer A: NaH_2PO_4 anh. 10 mM, pH 7,2
- b. Buffer F: NaH_2PO_4 anh. 10 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.8 M, pH 7,2
- c. Buffer G: NaH_2PO_4 anh. 150 mM, pH 7,2
- d. Isopropanol 20 %
- e. NaOH 0,5 N

3. Material a Cromatografiar

- a. Sobrenadante de sulfato de amonio proveniente del ejemplo anterior
- b. Condiciones de la muestra
 - 1) Volumen: 30.000 ml
 - 2) Masa proteica total medida por ensayo de Bradford: 20-40 gramos
 - 3) Concentración aproximada medida por ensayo de Bradford: 0,6-1,3 mg/ml



4) Conductividad: 190-210 mSi/cm

5) pH: 7,2

4. Sanitización y Equilibrado de la Precolumna (*)

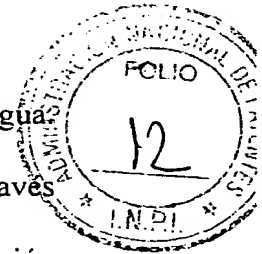
Para equilibrar la precolumna se procede a pasar por la misma, en forma secuencial, las siguientes soluciones o buffers en las cantidades que se detallan a continuación: 1,0 vc (2 litros) de agua; 1,0 vc (2 litros) de NaOH 0,5N ; 1,0 vc (2 litros) de Buffer G y finalmente 1,5 vc (3 litros) de Buffer F.

5. Sanitización y Equilibrado de la Columna (*)

Para equilibrar la columna se procede a pasar por la misma, en forma secuencial, las siguientes soluciones o buffers en las cantidades que se detallan a continuación: 1,0 vc (4 litros) de agua; 1,0 vc (4 litros) de isopropanol 20%; 1,0 vc (4 litros) de agua, 1,0 vc (4 litros) de NaOH 0,5N; 1,0 vc (4 litros) de agua ; 1,0 vc (4 litros) de Buffer G y finalmente 1,5 vc (6 litros) de Buffer F.

6. Condiciones de Corrida

Una vez equilibradas la precolumna y la columna, se conectan la segunda a continuación de la primera y se procede a sembrar el material a cromatografiar. Dicha siembra se realiza a una temperatura de 4 °C a un flujo de 100 ml/min. A continuación se realiza la elución al mismo flujo pero a temperatura ambiente, haciendo pasar las siguientes soluciones y buffers en el orden y cantidades detallados a continuación: 2,5 vc (10 litros) de Buffer F, (pasado este buffer se retira la precolumna). Una vez retirada la precolumna la corrida cromatográfica se sigue realizando sobre la columna de Phenyl Sepharose sobre la cual se realiza un gradiente de Buffer F-Buffer A partiendo de una proporción 85:15 de dichos buffers hasta llegar a una relación 50:50 de los mismos en un volumen total de 10 vc (40 litros). Terminado el gradiente se pasan 1,5 vc (6 litros)



de Buffer F-Buffer A en una proporción 30:70 y finalmente 1,5 vc (6 litros) de agua. Las fracciones seleccionadas, conteniendo EPO, son esterilizadas por filtración a través de una membrana porosa de 0,22 μm y se conservan a 4 °C. Este paso de separación rinde 7,5 gramos de EPO.

(*) vc significa volumen de columna

EJEMPLO 3. CONCENTRACIÓN Y DIAFILTRACIÓN

Las fracciones provenientes del ejemplo anterior son concentradas y diafiltradas de acuerdo a los siguientes parámetros y condiciones:

1. Equipamiento

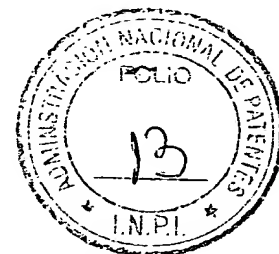
- a. Bomba peristáltica : Watson Marlow - Cat. N° 302S
- b. Tubuladura : Masterflex - Cat. N° 06402-18
- c. Concentrador : Prep Scale Millipore CDU F006LC

2. Soluciones y Buffers

- a. Dodecil sulfato de sodio (SDS) 10 mM
- b. Tritón X-100 1mM
- c. NaOH 0,1N
- d. Agua
- e. Buffer A : NaH_2PO_4 anh. 10 mM, pH 7,2

3. Material a Procesar

- a. Fracciones seleccionadas provenientes del ejemplo anterior
- b. Condiciones de la muestra
 - 1) Volumen: 7.000-10.000 ml
 - 2) Conductividad: 170-130 mSi/cm



3) pH: 7,2

4. Procedimiento

En primer lugar se procede a la limpieza, sanitización y equilibración del equipo haciendo pasar por el mismo la siguiente secuencia de soluciones y buffers: 10 litros de SDS 10 mM; 40 litros de agua; 10 litros de Tritón X-100 1 mM, 40 litros de agua; 10 litros de NaOH 0,1N; 40 litros de agua y finalmente 5 litros de Buffer A. De esta forma el equipo queda en condiciones de ser utilizado para realizar el proceso de concentración y diafiltración contra Buffer A de las fracciones seleccionadas, de acuerdo a la metodología corriente.

5. Condición Final de Concentración

- a. Volumen final de concentrado: 2.000 ml
- b. Diafiltrado contra: Buffer A
- c. Conductividad: 1.100-1.550 $\mu\text{Si/cm}$
- d. pH: 7,2

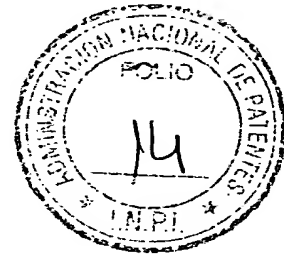
Este paso de separación rinde 7,2 gramos de EPO.

EJEMPLO 4. CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO

El material proveniente del ejemplo anterior es cromatografiado utilizando una matriz de intercambio aniónico de acuerdo a los siguientes parámetros y condiciones:

1. Equipamiento

- a. Columna
 - 1) Diámetro: 10 cm
 - 2) Altura de lecho: 25 cm
 - 3) Matriz



a) Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia)

b) Volumen: 2.000 ml

2. Soluciones y Buffers

- a. Buffer A: NaH_2PO_4 anh. 10 mM, pH 7,2
- b. Buffer G: NaH_2PO_4 anh. 150 mM, pH 7,2
- c. Buffer N: Ac. Acético 50 mM, NaCl 500 mM, pH 4,0
- d. Buffer S: Ac. Acético 50 mM, pH 4,0
- e. NaOH 0,5 N

3. Material a Cromatografiar

- a. Fracciones seleccionadas de interacción hidrofóbica, concentradas y diafiltradas.
- b. Condiciones de la muestra.
 - 1) Volumen: 2.000 ml
 - 2) Masa proteica total medida por ensayo de Bradford: 8,0-10 gramos
 - 3) Concentración aproximada medida por ensayo de Bradford: 4,0-5,0 mg/ml
 - 4) Conductividad: 1.100-1.550 $\mu\text{Si}/\text{cm}$
 - 5) pH : 7,2

4. Sanitización y Equilibrado de la Columna (*)

Para equilibrar la columna se procede a pasar por la misma, en forma secuencial, las siguientes soluciones o buffers en las cantidades que se detallan a continuación: 1,0 vc (2 litros) de agua; 1,0 vc (2 litros) de NaOH 0,5N; 1,0 vc (2 litros) de Buffer N; 2,0 vc (4 litros) de Buffer S; 3,0 vc (6 litros) de Buffer G; y finalmente 2,0 vc (4 litros) de Buffer A.



5. Condiciones de Corrida (*)

Una vez equilibrada la columna se procede a sembrar el material a cromatografiar. Dicha siembra se realiza a temperatura ambiente a un flujo de 100 ml/min. A continuación se realiza la elución al mismo flujo y temperatura, haciendo pasar las siguientes soluciones y buffers en el orden y cantidades detallados a continuación: 1,0 vc (2 litros) de Buffer A y 4,0 vc (8 litros) de Buffer S. A continuación se realiza un gradiente de Buffer S-Buffer N partiendo de una proporción 100:0 hasta llegar a una relación 50:50 de los mismos en un volumen total de 1.5 vc (3 litros). Terminado el gradiente se pasan 1,5 vc (3 litros) de Buffer N. Las fracciones seleccionadas, conteniendo EPO, son esterilizadas por filtración a través de una membrana porosa de 0,22 μ m y se conservan a 4 °C. Este paso de separación rinde 5,9 gramos de EPO.

(*) vc significa volumen de columna

EJEMPLO 5. CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO CATIÓNICO

El material proveniente del ejemplo anterior es cromatografiado utilizando una matriz de intercambio catiónico de acuerdo a los siguientes parámetros y condiciones:

1. Equipamiento

a. Columna

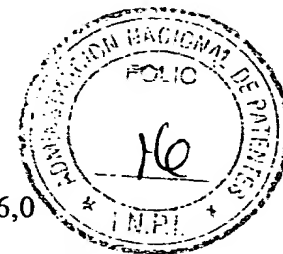
1) Diámetro: 10 cm

2) Altura de lecho: 25 cm

3) Matriz

a) SP-Sepharose Fast Flow. (Farmacia)

b) Volumen : 2.000 ml



2. Soluciones y Buffers

- a. Buffer D: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 12,5 mM, Ac. Cítrico. H_2O 4 mM, pH 6,0
- b. Buffer E: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 12,5 mM, Ac. Cítrico. H_2O 4 mM, NaCl 0,5M ,
pH 6,0
- c. NaOH 0,5 N

3. Material a Cromatografiar

- a. Fracción seleccionada en el ejemplo anterior ajustada a pH 6,0 con NaOH cc.
y diluida hasta alcanzar una conductividad de 4.800 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (conductividad
igual a Buffer D-Buffer E 93,5:6,5)
- b. Condiciones de la muestra
 - 1) Volumen: 5.000 ml
 - 2) Masa proteica total medida por ensayo de Bradford: 4,5-6,5 gramos
 - 3) Concentración aproximada medida por ensayo de Bradford: 0,9-1,3
mg/ml
 - 4) Conductividad: 4.800 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Igual a Buffer D-Buffer E en una
proporción 93,5:6,5)
 - 5) pH: 6,0

4. Sanitización y Equilibrado de la Columna (*)

Para equilibrar la columna se procede a pasar por la misma, en forma secuencial, las siguientes soluciones o buffers en las cantidades que se detallan a continuación: 1,0 vc (2 litros) de agua; 1,0 vc (2 litros) de NaOH 0,5N; 1,0 vc (2 litros) de Buffer E y finalmente 1,5 vc (3 litros) de Buffer D-Buffer E en una proporción 93,5:6,5



5. Condiciones de Corrida (*)

Una vez equilibrada la columna se procede a sembrar el material a cromatografiar. Dicha siembra se realiza a temperatura ambiente a un flujo de 100 ml/min. A continuación se realiza la elución al mismo flujo y temperatura, haciendo pasar las siguientes soluciones y buffers en el orden y cantidades detallados a continuación: 1,5 vc (3 litros) de Buffer D-Buffer E en una proporción 93,5:6,5. A continuación se realiza un gradiente de Buffer D-Buffer E partiendo de una proporción 93,5:6,5 de dichos buffer hasta llegar a una relación 50:50 de los mismos en un volumen total de 2,0 vc (4 litros). Terminado el gradiente se pasan 1,5 vc (3 litros) de Buffer E. Las fracciones seleccionadas, conteniendo EPO son esterilizadas por filtración a través de una membrana porosa de 0,22 μ m y se conservan a 4 °C. Este paso de separación rinde 4,2 gramos de EPO.

(*) vc significa volumen de columna

EJEMPLO 6. CONCENTRACIÓN Y DIAFILTRACIÓN

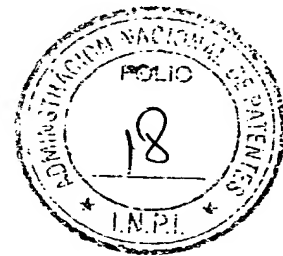
Las fracciones provenientes del ejemplo anterior son concentradas y diafiltradas de acuerdo a los siguientes parámetros y condiciones:

1. Equipamiento

- a. Bomba peristáltica: Watson Marlow - Cat. N° 302S
- b. Tubuladura: Masterflex - Cat. N° 06402-18
- c. Concentrador: Prep Scale Millipore CDU F002LC

2. Soluciones y Buffers

- a. Dodecil sulfato de sodio (SDS) 10 mM
- b. Tritón X-100 1mM



c. NaOH 0,1N

d. Agua

e. Buffer B : NaH_2PO_4 anh. 10 mM, NaCl 0,5 M, Lactosa 0,05 mg/ml, pH 7,2

3. Material a Procesar

a. Fracciones seleccionadas en el ejemplo anterior

b. Condiciones de la muestra

1) Volumen: 8.000 ml

2) Masa proteica total medida por ensayo de Bradford: 3,5-4,5 gramos

3) Concentración aproximada medida por ensayo de Bradford: 0,4-0,6 mg/ml

4) Conductividad: 5.000-8.000 $\mu\text{Si}/\text{cm}$

5) pH: 6,0

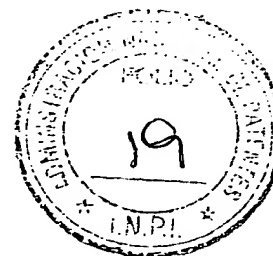
4. Procedimiento

En primer lugar se procede a la limpieza, sanitización y equilibración del equipo haciendo pasar por el mismo la siguiente secuencia de soluciones y buffers: 10 litros de SDS 10 mM; 40 litros de agua; 10 litros de Tritón X-100 1 mM, 40 litros de agua; 10 litros de NaOH 0,1N; 40 litros de agua y finalmente 5 litros de Buffer B. De esta forma el equipo queda en condiciones de ser utilizado para realizar el proceso de concentración y diafiltración contra Buffer B de las fracciones seleccionadas, de acuerdo a la metodología corriente.

5. Condición Final de Concentración

a. Volumen final de concentrado: 400 ml

b. Diafiltrado contra: Buffer B



- c. Conductividad: 15.500-19.000 $\mu\text{Si}/\text{cm}$
- d. pH: 7,2
- e. Conservación: a 4°C

Este paso de separación rinde 4,0 gramos de EPO.

EJEMPLO 7. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

El material proveniente del paso anterior es cromatografiado utilizando una matriz de exclusión molecular de acuerdo a los siguientes parámetros y condiciones:

1. Equipamiento

a. Columna

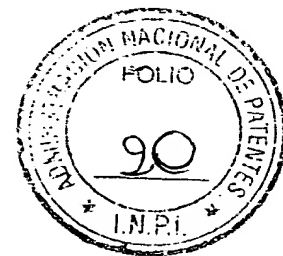
- 1) Diámetro: 10 cm
- 2) Altura de lecho: 76 cm
- 3) Matriz
 - a) Sephacryl S-200 HP (Pharmacia)
 - b) Volumen: 6.000 ml

2. Soluciones y Buffers

- a. Buffer B: NaH_2PO_4 anh. 10 mM, NaCl 0,15 M, Lactosa 0,05 mg/ml, pH 7,2
- b. NaOH 0,5 N

3. Material a Cromatografiar

- a. Fracciones seleccionadas en el ejemplo anterior concentradas
- b. Condiciones de la muestra
 - 1) Volumen: 400 ml
 - 2) Masa proteica total medida por ensayo de Bradford: 3,5-4,5 gramos
 - 3) Concentración aproximada medida por ensayo de Bradford: 8,5-11 mg/ml



4) Conductividad: 15.500-19.000 $\mu\text{Si/cm}$

5) pH: 7,2

4. Sanitización y Equilibrado de la Columna (*)

Para equilibrar la columna se procede a pasar por la misma, en forma secuencial, las siguientes soluciones o buffers en las cantidades que se detallan a continuación: 1,0 vc (6 litros) de agua; 1,5 vc (9 litros) de NaOH 0,5N y finalmente 3,0 vc (18 litros) de Buffer B.

5. Condiciones de Corrida (*)

Una vez equilibrada la columna se procede a sembrar 100 ml del material a cromatografiar. Dicha siembra se realiza a temperatura ambiente a un flujo de 35 ml/min. A continuación se realiza la elución al mismo flujo y temperatura, haciendo pasar 0,75 vc (4,5 litros) de Buffer B. Este procedimiento se repite 4 veces, es decir, hasta finalizar el material a cromatografiar. Las fracciones seleccionadas, conteniendo EPO son esterilizadas por filtración a través de una membrana porosa de 0,22 μm y se conservan a 4 °C. Este paso de separación rinde 3,2 gramos de EPO con un 99 % de pureza.

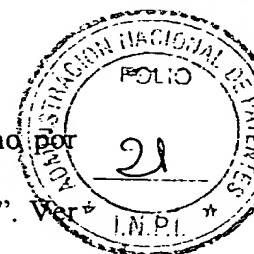
(*) vc significa volumen de columna

El paso anterior concluye el proceso de purificación obteniéndose EPO humana recombinante con un grado de pureza superior al 99 % y con rendimiento global del proceso aproximado al 30 % siguiéndose la secuencia reclamada en la reivindicación 2.

Una muestra de la EPO obtenida utilizando el proceso descrito fue sometida a los análisis siguientes para demostrar su identidad y pureza:

1. En un gel desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) la EPO purificada

observó una banda ancha de más de 30 kDa de peso molecular. Ver Fig. 1.



2. La EPO purificada fue reconocida por un anticuerpo monoclonal así como por un anticuerpo policlonal contra EPO humana en un ensayo "Western Blot". Ver Fig. 2.

3. El tratamiento con glicanasas de la EPO purificada probó la existencia de las cadenas glicosídicas en cantidad y peso molecular acorde a lo esperado para EPO. Ver Fig. 3.

4. La EPO purificada mostró estar compuesta por una serie de especies o isoformas de punto isoelectrico comprendido entre 3,0 y 4,5. Ver Fig. 4.

5. La secuenciación completa de aminoácidos de EPO purificada mostró total homología con la EPO humana natural que posee la siguiente secuencia de 165 aminoácidos.

NH2—	Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg
	Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu	Leu	Glu	Ala	Lys
	Glu	Ala	Glu	<u>Asn</u>	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala
	Glu	Hys	Cys	Ser	Leu	Asn	Glu	<u>Asn</u>	Ile	Thr
	Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe	Tyr	Ala
	Trp	Lys	Arg	Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala
	Val	Glu	Val	Trp	Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu
	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu
	Leu	Val	<u>Asn</u>	Ser	Ser	Gln	Pro	Trp	Glu	Pro
	Leu	Gln	Leu	Hys	Val	Asp	Lys	Ala	Val	Ser
	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg
	Ala	Leu	Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser
	Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	<u>Ser</u>	Ala	Ala	Pro	Leu

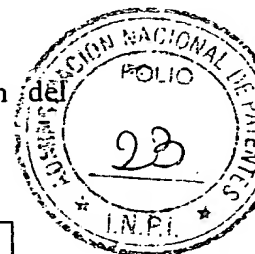


Arg	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	L
Leu	Phe	Arg	Val	Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg
Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala
Cys	Arg	Thr	Gly	Asp-COOH					

X sitios de glicosilación

6. La presencia de los cuatro sitios de glicosilación sobre la cadena de 165 aminoácidos, así como la estructura compleja de hidratos de carbono, y fundamentalmente los residuos de ácido siálico terminales, fueron demostrados conjuntamente con su correcta actividad biológica *in vivo*, en el modelo de ensayo del ratón policitémico ex-hipóxico, exhibiendo total paralelismo frente al estándar internacional correspondiente.
7. Una muestra de la EPO obtenida mediante el procedimiento descrito fue sometida a un análisis de cromatografía líquida de alta presión de fase reversa y de exclusión molecular. En ambos casos se demostró una pureza superior al 99%.
Ver Figs. 5 y 6.

8. La tabla siguiente ilustra la recuperación de cada paso de separación del procedimiento reivindicado.



Etapa	Recuperación (%)
Sobrenadante de Cultivo de Células	100
Cromatografía de Interacción Hidrofóbica	70
Concentración y Diafiltración I	97
Cromatografía de Intercambio Aniónico	82
Cromatografía de Intercambio Catiónico	71
Concentración y Diafiltración II	95
Cromatografía de Exclusión Molecular	79

9. La tabla siguiente ilustra la recuperación acumulada del procedimiento reclamado en la reivindicación 2.

Etapa	Recuperación (%) Acumulada
Sobrenadante de Cultivo de Células	100
Cromatografía de Interacción Hidrofóbica	70
Concentración y Diafiltración I	68
Cromatografía de Intercambio Aniónico	56
Cromatografía de Intercambio Catiónico	40
Concentración y Diafiltración II	38
Cromatografía de Exclusión Molecular	30

V. Descripción de Diagramas

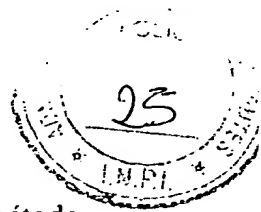
La Fig. 1 ilustra un análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de una muestra de EPO pura, obtenida según el método descrito. En las calles 1, 4 y 7 se ven los marcadores de peso molecular. En las calles 2, 3, 5 y 6 se corrieron diferentes masas de EPO pura obtenida según el proceso reivindicado. Puede apreciarse la pureza del producto obtenido y su peso molecular aparente de algo más de 30 kDa que coincide con el de la EPO humana urinaria.

La Fig. 2 ilustra un análisis "Western Blot" de una muestra de EPO obtenida según el método descrito. Se verifica la identidad de la EPO purificada, ya que es reconocida por un anticuerpo anti-EPO humana. En la calle 1 se corrió un estándar de EPO humana, en la calle 2 marcadores de peso molecular y en las calles 3 a 5 muestras de EPO obtenidas según el método reivindicado.

La Fig. 3 ilustra un análisis por SDS-PAGE de una muestra de EPO pura obtenida según el método descrito, tratada con glicanasas. Los marcadores de peso molecular se corrieron en las calles 1, 4 y 8. En las calles 2 y 7 se ve EPO sin tratar. En la calle 3 se corrió EPO tratada con O-glicanasa; se verifica la presencia de una O-glicosilación. En la calle 5 se corrió EPO parcialmente degradada con N-glicanasa; se verifica la presencia de 3 N-glicosilaciones con los pesos moleculares correspondientes a los esperados para la EPO. En la calle 6 se corrió EPO degradada con O-glicanasa y N-glicanasa, obteniéndose el peso molecular esperado para la proteína totalmente deglicosilada.

La Fig. 4 ilustra un estudio de los puntos isoelectricos de muestras de EPO pura producidas según el método descrito. Las muestras de EPO se corrieron en las calles 2, 3 y 4, los marcadores de punto isoelectrico en las calles 1 y 5. Se verifica la presencia de las formas correspondientes a EPO, con puntos isoelectricos comprendidos entre 3,0 y

AR 98-01-05610



4,5.

La Fig. 5 revela la pureza de una muestra de EPO producida según el método descrito utilizando una cromatografía líquida de alta presión en fase reversa.

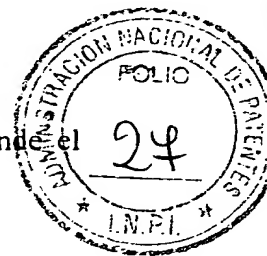
La Fig. 6 revela la pureza de una muestra de EPO producida según el método descrito utilizando una cromatografía líquida de alta presión de exclusión molecular.



VI. Reivindicaciones

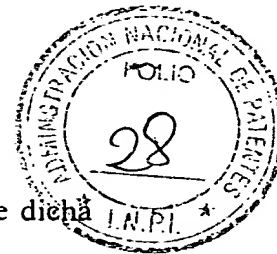
Habiendo descrito y ejemplificado la naturaleza y objeto principal de la presente invención, así como también la manera en que la misma se puede llevar a la práctica, se declara reivindicar como de propiedad y de derechos exclusivos:

1. UN PROCEDIMIENTO PARA LA PURIFICACIÓN DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE A PARTIR DE SOBRENADANTES DE CULTIVO DE CÉLULAS caracterizado por incluir las siguientes etapas:
 - a) precipitación diferencial;
 - b) cromatografía de interacción hidrofóbica;
 - c) concentración y diafiltración;
 - d) cromatografía de intercambio aniónico;
 - e) cromatografía de intercambio catiónico;
 - f) concentración y diafiltración;
 - g) cromatografía de exclusión molecular.
2. UN PROCEDIMIENTO, según caracterizado en la reivindicación 1, donde los pasos de a) hasta g) son realizados en la siguiente secuencia: a), b), c), d), e), f) y g).
3. UN PROCEDIMIENTO, según caracterizado en la reivindicación 1, donde los pasos de a) hasta g) son realizados en la siguiente secuencia: a), c), d), e), b), f) y g).
4. UN PROCEDIMIENTO, según caracterizado en la reivindicación 1, donde el paso a) comprende añadir sulfato de amonio al sobrenadante de cultivo, seguido de centrifugación.



5. UN PROCEDIMIENTO, según caracterizado en la reivindicación 1, donde el paso b) comprende utilizar una matriz de interacción hidrofóbica.
6. UN PROCEDIMIENTO, según caracterizado en la reivindicación 5, donde la matriz de interacción hidrofóbica utilizada es Phenyl Sepharose 6 Fast Flow.
7. UN PROCEDIMIENTO, según caracterizado en la reivindicación 1, donde el paso d) comprende utilizar una matriz de intercambio aniónico.
8. UN PROCEDIMIENTO, según caracterizado en la reivindicación 7, donde la matriz de intercambio aniónico utilizada es Q-Sepharose Fast Flow.
9. UN PROCEDIMIENTO, según caracterizado en la reivindicación 1, donde el paso e) comprende utilizar una matriz de intercambio catiónico.
10. UN PROCEDIMIENTO, según caracterizado en la reivindicación 9, donde la matriz de intercambio catiónico utilizada es SP-Sepharose Fast Flow.
11. UN PROCEDIMIENTO, según caracterizado en la reivindicación 1, donde el paso g) comprende utilizar una matriz de exclusión molecular.
12. UN PROCEDIMIENTO, según caracterizado en la reivindicación 11, donde la matriz de exclusión molecular utilizada es Sephacryl S-200 HP.
13. ERITROPOYETINA, sustancialmente pura, obtenida según el procedimiento caracterizado en la reivindicación 1.
14. ERITROPOYETINA, según caracterizada en la reivindicación 13, donde dicha sustancia posee una pureza mayor al 99 % según determinada por un análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y cromatografías líquidas de alta presión en fase reversa y de exclusión molecular.
15. ERITROPOYETINA, según caracterizada en la reivindicación 13, donde dicha sustancia está compuesta por una serie de isoformas de punto isoelectrico

comprendido entre 3,0 y 4,5.



16. ERITROPOYETINA, según caracterizada en la reivindicación 13, donde dicha sustancia muestra total homología con la eritropoyetina humana natural que posee la siguiente secuencia de aminoácidos:

NH2—	Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg
	Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu	Leu	Glu	Ala	Lys
	Glu	Ala	Glu	<u>Asn</u>	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala
	Glu	Hys	Cys	Ser	Leu	Asn	Glu	<u>Asn</u>	Ile	Thr
	Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe	Tyr	Ala
	Trp	Lys	Arg	Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala
	Val	Glu	Val	Trp	Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu
	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu
	Leu	Val	<u>Asn</u>	Ser	Ser	Gln	Pro	Trp	Glu	Pro
	Leu	Gln	Leu	Hys	Val	Asp	Lys	Ala	Val	Ser
	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg
	Ala	Leu	Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser
	Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	<u>Ser</u>	Ala	Ala	Pro	Leu
	Arg	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys
	Leu	Phe	Arg	Val	Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg
	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala
	Cys	Arg	Thr	Gly	Asp—COOH					

X sitios de glicosilación

BIO SIDUS S. A.
HUBERTO M. DE PASQUALE
AFDOERADO

VII. Diagramas

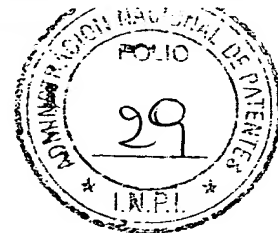


Fig. 1. Análisis por Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)



Fig. 2. Análisis "Western Blot"

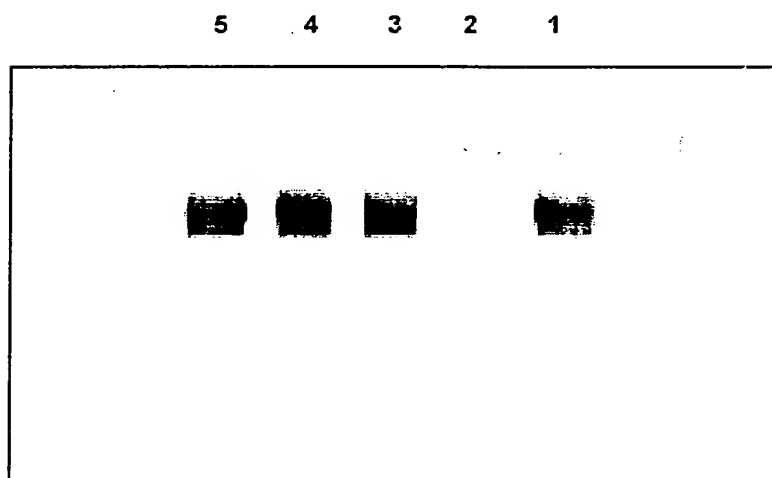


Fig. 3. Análisis por SDS-PAGE de la Digestión de EPO con Glicanasas

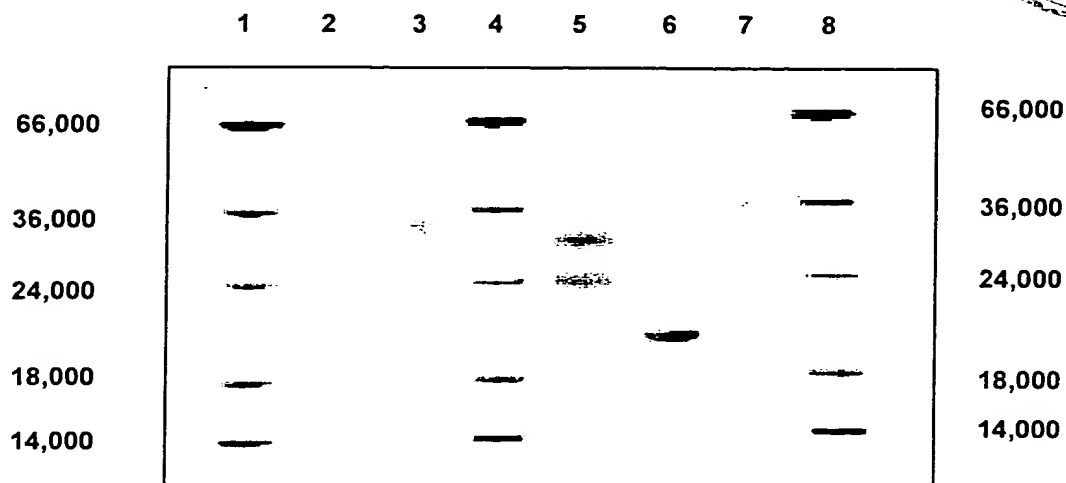
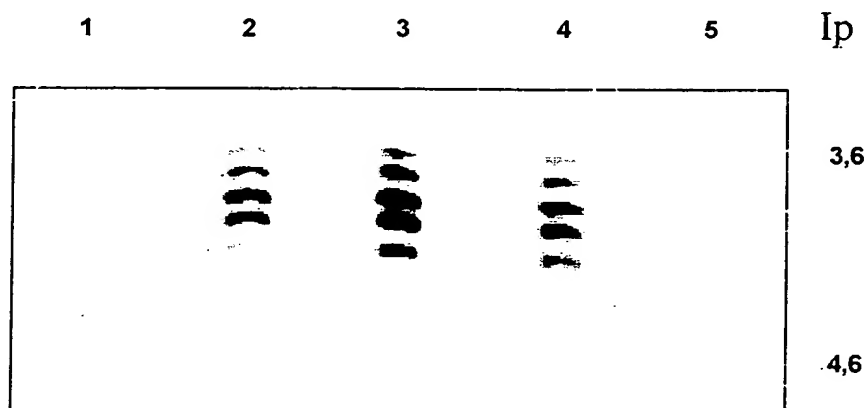


Fig. 4. Determinación de Punto Isoeléctrico (Isoelectroenfoque)



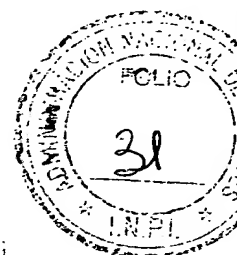


Fig. 5. Cromatografía Líquida de Alta Presión en Fase Reversa

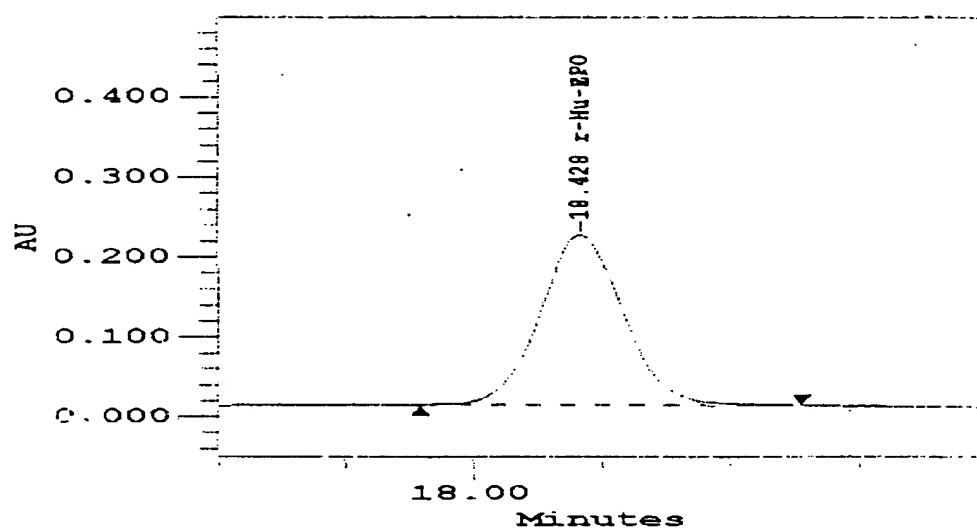
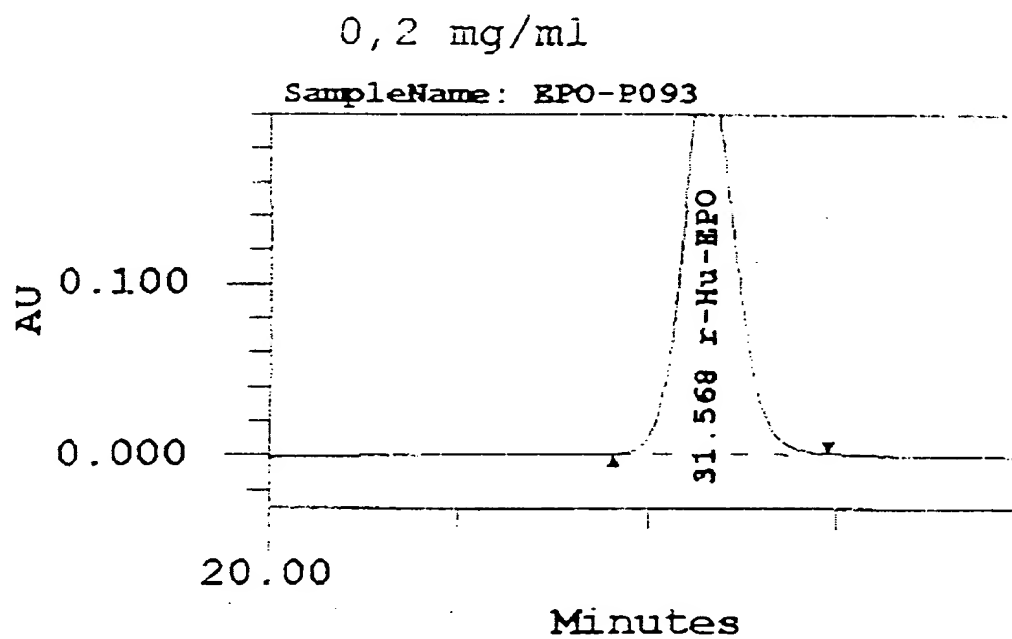
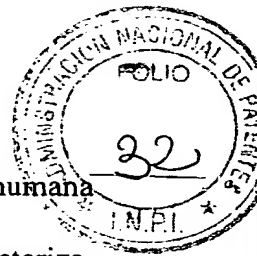


Fig. 6. Cromatografía Líquida de Alta Presión de Exclusión Molecular





VIII. Resumen

La presente invención se refiere a un método para la obtención de EPO humana recombinante de alto grado de pureza. El procedimiento reivindicado se caracteriza, además, por evitar exponer la proteína a condiciones extremas de temperatura y a solventes orgánicos que pudieran afectar su actividad biológica o resultar tóxicos para su uso en seres humanos.

El procedimiento consiste en una precipitación diferencial, una cromatografía de interacción hidrofóbica, concentración y diafiltración, cromatografía sucesiva aniónica y catiónica, nueva concentración y diafiltración y cromatografía de exclusión molecular. El procedimiento se distingue por no utilizar pasos de cromatografía líquida de alta presión y por un alto porcentaje de recuperación de EPO.

La invención comprende también a la EPO obtenida según el procedimiento descrito.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200